

論文内容の要旨

論文提出者氏名 和田 誠

論文題目

The dual RAF/MEK inhibitor CH5126766/R05126766 may be a potential therapy for RAS-mutated tumor cells

論文内容の要旨

<緒言>

転移性悪性黒色腫患者の予後は極めて悪く、5年生存率は5%未満であり、そのことは従来の化学療法や免疫療法が効かなかったことを意味している。近年 BRAF 阻害剤や抗 CTLA-4 抗体などの新たな治療薬が登場し生存率を改善した。ヒト悪性黒色腫のうち多くは NRAS や BRAF 変異の結果、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路が恒常的に活性化している。vemurafenib や dabrafenib といった BRAF 阻害剤は転移性悪性黒色腫患者に対し顕著な効果を示したが、BRAF 変異のない悪性黒色腫患者に対しては効果を示さなかった。BRAF 阻害剤は RAS 変異の細胞において、逆説的に MAPK 経路を活性化することが判明した。我々は p27 を誘導する化合物スクリーニングの結果、新規 RAF/MEK 阻害剤 CH5126766 を見出した。CH5126766 は RAF キナーゼを阻害するという独特の性質を持ち合わせており、RAF が MEK に強く結合し、CH5126766 が MEK に結合した結果、RAF が MEK と離れることができずリン酸化もされない。

今回我々は、新規 RAF/MEK 阻害剤 CH5126766 が BRAF 変異細胞のみならず RAS 変異細胞に対しても細胞増殖を抑制し、CH5126766 が RAS 変異悪性腫瘍に対して新たな治療法となりうることを報告する。

<結果>

BRAF、NRAS 変異悪性黒色腫を含めた8種類の細胞株に対して RAF 阻害剤 PLX4720 (以下、PLX)、MEK 阻害剤 PD0325901 (以下、PD)、RAF/MEK 阻害剤 CH5126766 (以下、CH) に対する感受性を WST-8 assay を用いて検討した。BRAF (V600E) 変異を有する細胞は CH、PD、PLX で細胞増殖が抑制されたが、BRAF 変異がなく NRAS、KRAS 変異の細胞は CH、PD で増殖が抑制されたが、PLX では抑制されなかった。PTEN 変異を有する PC3 細胞は CH、PD、PLX すべてに対して耐性であった。

フローサイトメトリーによる細胞周期解析では SK-MEL-28 (BRAF 変異) 悪性黒色腫細胞、SK-MEL-2 (NRAS 変異) 悪性黒色腫細胞に対し、CH、PD は濃度依存性に G1 期細胞周期停止を誘導したがアポトーシスは認めなかった。ウェスタンブロット法では MEK のリン酸化が両細胞において CH で抑制されたが、SK-MEL-2 細胞ではリン酸化 MEK が PD で上昇した。CH、PD は共に両細胞に対して ERK のリン酸化を抑制し、p27 を誘導

した。一方、CH は SK-MEL-2 細胞において PD より有意に cyclinD1 の発現量を減少させたが、SK-MEL-28 細胞では CH と PD は cyclinD1 を同程度抑制した。コロニー抑制試験では SK-MEL-28 細胞に対し CH と PD は同程度コロニー形成を抑制したが、SK-MEL-2 細胞では CH は PD より有意に抑制した。

RAF 阻害剤が MEK 阻害剤投与時におけるリン酸化 MEK の上昇を抑制できるかを調べるために、我々は NRAS 変異の SK-MEL-2 細胞において PLX と PD を同時投与した。PLX は、SK-MEL-2 細胞において PD による ERK と RB の脱リン酸化を打ち消した。次に我々は、PLX と PD の併用もしくは CH を用いて SK-MEL-2 細胞でコロニー抑制試験を行った。PD の単独投与ではコロニー形成が抑制されたが、PLX と PD の同時投与ではコロニー形成を抑制しなかったことから、PLX による PD の効果の減弱が認められた。一方で、RAF/MEK 阻害剤である CH は、顕著に NRAS 変異の悪性黒色腫 SK-MEL-2 細胞において RAF-MEK 経路を阻害することでコロニー形成を抑制した。さらに我々は、KRAS 変異を有する膵臓癌細胞株 MIA PaCa-2 と大腸癌細胞株 SW480 を用いて解析を行った。両細胞において CH は MEK のリン酸化を抑制したが、PD は上昇させた。両阻害剤は両細胞においてリン酸化 RB を抑制し、MIA PaCa-2 細胞では cyclinD1 の発現量を下げ、p27 を上げたが SW480 細胞では、それらの現象は認められなかった。コロニー抑制試験では、CH は PD より有意にコロニー形成を抑制した。PLX は MIA PaCa-2 細胞において PD による ERK のリン酸化の抑制を打ち消した。同様に、MIA PaCa-2 細胞において PD 単独投与はコロニー形成を抑制したが、PLX と PD の同時投与はコロニー形成を抑制しなかった。

MEK 阻害剤投与におけるリン酸化 MEK の上昇を制御する分子を見出すために BRAF および CRAF の siRNA を用いた。SK-MEL-2 細胞において siCRAF によってリン酸化 MEK とリン酸化 ERK が減弱したが、siBRAF では変化がなかった。これらの結果は NRAS 変異の細胞において BRAF ではなく CRAF が MEK をリン酸化していることを意味している。CRAF のノックダウンは MEK 阻害剤 PD によるリン酸化 MEK の上昇を抑制し、BRAF と CRAF の同時ノックダウンも同様に抑制した。さらに我々は、CH の増殖抑制能を SK-MEL-2 細胞の細胞移植モデルマウスを用いて検証した。CH は 10% 以上の体重減少を来すことなく、腫瘍の増大を抑制した。

<考察>

本研究において我々は新規 RAF/MEK 阻害剤 CH5126766 が NRAS 変異悪性黒色腫細胞に対して増殖抑制効果を示すことを見出した。CH5126766 は RAF のリン酸化能を阻害し MEK 阻害剤による RAF/MEK の再活性化も生じないことも見出された。また KRAS 変異を有する細胞に対しても NRAS 変異悪性黒色腫と同様に増殖抑制効果を示すことが明らかにされ、今後 RAS 変異悪性腫瘍に対する治療選択の一つとなり得ると考えられた。